



**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**Διασπορά γονιδίων που εμπλέκονται στην αποδόμηση καρβαμικών εντομοκτόνων σε
εδάφη από το οροπέδιο Λασιθίου: Συσχέτιση μεταξύ αφθονίας καταβολικών γονιδίων
και αποδόμησης καρβαμικών εντομοκτόνων.**

Μυτή Δέσποινα

Λάρισα 2016

Διασπορά γονιδίων που εμπλέκονται στην αποδόμηση καρβαμδικών εντομοκτόνων σε εδάφη από το οροπέδιο Λασιθίου: Συσχέτιση μεταξύ αφθονίας καταβολικών γονιδίων και αποδόμησης καρβαμδικών εντομοκτόνων.

Genes involved in degradation of carbamate insecticides in soil from the plateau of Lasithi: Correlation between abundance of catabolic degradation genes and carbamate insecticides.

Επιβλέπων: Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μόσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Με το τέλος του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Καρπούζα Δημήτρη, αναπληρωτή καθηγητή περιβαλλοντικής μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική αυτή εργασία, για την βοήθειά του και την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκειά της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα την Ρουσίδου Κωνσταντίνα, διδακτορική ερευνήτρια, για την συνεχή και αμέριστη βοήθειά της σε όλα τα στάδια της εργασίας αυτής, για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου και την πολύ όμορφη συνεργασία όλους αυτούς τους μήνες. Ευχαριστώ πολύ και την κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, αναπληρώτρια καθηγήτρια βιοτεχνολογίας φυτών, καθώς και τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο, επίκουρο καθηγητή βιοτεχνολογίας μικροβίων, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία καθώς και την Κοσκινιώτη Γιώτα, διδακτορική ερευνήτρια του τμήματος, για την ενθάρρυνση και τις πολύτιμες συμβουλές της. Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια και τους ανθρώπους που δεν ήταν αλλά έγιναν οικογένειά μου, για τη δύναμη και τη βοήθεια που μου έδωσαν.

Περίληψη

Η βιολογική αποδόμηση αποτελεί την κύρια διεργασία απομάκρυνσης των καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ουσιών από το περιβάλλον. Στην ακραία της μορφή μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτατη αποδόμηση των καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ουσιών ως αποτέλεσμα της δράσης μικροοργανισμών που έχουν προσαρμοστεί στις ουσίες αυτές αναπτύσσοντας ή αποκτώντας εξειδικευμένα καταβολικά γονίδια/ένζυμα με τελικό αποτέλεσμα την απώλεια της βιολογικής δράσης των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανίχνευση του γονιδίου *mcd* που κωδικοποιεί μια υδρολάση υπεύθυνη για την υδρόλυση του καρβαμιδικού εντομοκτόνου carbofuran σε έδαφος από το οροπέδιο Λασιθίου στο οποίο δεν είχε χρησιμοποιηθεί carbofuran από το έτος 2005. Παράλληλα στο συγκεκριμένο έδαφος μελετήθηκε η αποδόμηση μιας νέας δόσης του carbofuran και η σχετική αφθονία του γονιδίου *mcd* κατά την πορεία αποδόμησης του carbofuran. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η εφαρμογή carbofuran στο συγκεκριμένο έδαφος προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της σχετικής αφθονίας του γονιδίου *mcd*, του οποίου το μοτίβο αύξησης παρουσίασε θετική συσχέτιση με την αποδόμηση του carbofuran στο συγκεκριμένο έδαφος. Η παρουσία του γονιδίου *mcd* στο συγκεκριμένο έδαφος σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα (κάτω από το όριο ανίχνευση της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου που χρησιμοποιήθηκε) κατά την περίοδο μη εφαρμογής του carbofuran καταδεικνύει την εμμονή του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης για ορισμένες φυτοπροστατευτικές ουσίες. Από την άλλη μεριά ο εντοπισμός του συγκεκριμένου γονιδίου σε αγροτικά εδάφη στην Ελλάδα αποτελεί πρώτη αναφορά και συνάδει με την ευρύτερη γεωγραφική διασπορά του *mcd* πιθανότατα μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς.

Abstract

Biodegradation constitutes the main process controlling the dissipation of carbamate pesticides in the environment. In each extreme, biodegradation could lead to the rapid degradation of carbamates by soil microorganisms which have evolved genetic mechanisms to rapidly hydrolyse those chemical with final result the loss of biological efficacy of the applied pesticides. In the current thesis we studied the detection of the *mcd* gene which is responsible for the hydrolysis of the carbamate insecticide carbofuran in a soil from the Plateau of Lasithi where carbofuran was last applied in 2005. In parallel in the same soil we studied the degradation of a fresh carbofuran addition in relation with the relative abundance of the *mcd* gene during the degradation of carbofuran. Our results indicated that a fresh addition of carbofuran stimulated a significant increase in the abundance of *mcd* which coincided with the degradation of carbofuran suggesting its involvement in the degradation of this carbamate in soil. The detection of the *mcd* gene in the specific soil, although in particularly low levels (below the limit of detection of the q-PCR method utilized) before the application of carbofuran provides evidence for the persistence of the phenomenon of enhanced biodegradation of specific pesticides like carbofuran. On the other hand, our study provides the first report for the detection of the *mcd* gene in agricultural field soils in Greece and adds to its wide geographical dispersion probably due to horizontal gene transfer.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.2 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα.....	10
1.3 Τύχη φυτοπροστατευτικών προϊόντων.....	10
1.4 Αποδόμηση-Διάσπαση φυτοπροστατευτικών προϊόντων	11
1.4.1 Αβιοτική διάσπαση.....	11
1.4.2 Βιοτική αποδόμηση.....	11
1.4.2.1 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση.....	12
1.5 Καρβαμικά – Carbamates.....	13
1.5.1 Τρόπος δράσης καρβαμικών.....	13
1.5.2 Διάσπαση καρβαμικών φυτοπροστατευτικών ουσιών	15
1.6 Carbofuran.....	16
1.7 <i>Mcd</i> γονίδιο	17
1.8 Στόχοι της παρούσας εργασίας.....	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Δείγμα Εδάφους.....	19
2.2 Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα.....	19
2.3 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	19
2.4 Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων του carbofuran στο έδαφος.....	20
2.4.1 Εκχύλιση του carbofuran από το έδαφος	20
2.4.2 Χρωματογραφικός προσδιορισμός του carbofuran	20
2.5 Προσδιορισμός της αφθονίας των γονιδίων <i>mcd</i> και 16S rRNA	21
2.5.1 Εκχύλιση DNA από το έδαφος.....	21
2.5.2 Εκτίμηση της αφθονίας των γονιδίων <i>mcd</i> και 16s rRNA στο έδαφος με PCR πραγματικού χρόνου.....	22
2.6 Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του γονιδίου <i>mcd</i> με αλληλούχιση	26
2.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
3.1 Αποδόμηση του carbofuran στο έδαφος.....	28
3.2 Εκτίμηση της αφθονίας των γονιδίων <i>mcd</i> και 16S rRNA.....	29
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
4.1 Συσχέτιση μεταξύ της σχετικής αφθονίας του γονιδίου <i>mcd</i> και της αποδόμησης του carbofuran	33

4.2 Μελλοντική έρευνα.....	34
5. Βιβλιογραφία.....	36

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γεωργία στις μέρες μας διενεργείται πιο επισταμένα από ποτέ. Η ανάγκη για περισσότερα και καλύτερης ποιότητας παραγόμενα προϊόντα οδήγησαν τον άνθρωπο να ψάξει ουσίες που θα διαφυλάξουν την παραγωγή του. Έτσι αναπόφευκτα οδηγήθηκε στην παραγωγή ξενοβιοτικών ουσιών που σαν αποτέλεσμα θα είχαν την καταπολέμηση των εντόμων, παρασίτων, μυκήτων κτλ. Αρχίζοντας από προϊόντα φυσικής προέλευσης όπως το θείο, η νικοτίνη, η ρετινόνη και χημικές ουσίες όπως το αρσενικό ασβέστιο έφτασε στην παραγωγή πιο σύνθετων οργανικών ενώσεων. Πάντως η συστηματική χρήση πολυάριθμων συνθετικών οργανικών ουσιών με πολύπλοκη χημική δομή ξεκίνησε από το 1950 και μετά όπου και παρατηρείται μεγάλη αύξηση στις σοδειές αλλά και δραματική αύξηση του ρυθμού αύξησης των παραγόμενων γεωργικών προϊόντων παγκοσμίως, με παράλληλη μια μόνο μικρή αύξηση της καλλιεργούμενης γης. Αιτία λοιπόν της αύξησης της παραγωγής δεν ήταν άλλος λόγος παρά η ευρεία χρήση προηγμένων γεωργικών φαρμάκων, όπως ενώσεων οργανοχλωριωμένων (DDT και συγγενή του). Ωστόσο, από τις πρώτες δεκαετίες της ευρείας χρήσης τους άρχισαν να διατυπώνονται φόβοι και επιφυλάξεις για την ασφάλεια των γεωργικών φαρμάκων καθώς φάνηκε πως η χρήση τους μπορεί να οδηγήσει στη ρύπανση του περιβάλλοντος αλλά και σε κινδύνους για τον άνθρωπο, είτε λόγω της απευθείας έκθεσης είτε λόγω έμμεσης έκθεσης στα υπολείμματά τους στις τροφές και το νερό. Έτσι τα γεωργικά φάρμακα εξελίσσονται μέσα στον χρόνο ανταποκρινόμενα στις ανάγκες του ανθρώπου με σκοπό να γίνουν πιο ασφαλή για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, λιγότερο τοξικά, πιο αποτελεσματικά και λιγότερο υπολειμματικά. Στην προσπάθεια αυτή καταργήθηκαν πολλά από τα λιπόφιλα και ιδιαίτερα υπολειμματικά οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και έγινε ευρύτερη η χρήση των οργανοφωσφορικών αλλά και των καρβαμιδικών ενώσεων, που ήταν και λύση στο πρόβλημα της προσαρμογής των μικροοργανισμών στην επαναλαμβανόμενη χρήση των οργανοφωσφορικών ενώσεων. Έτσι έχει αναδειχθεί το πρόβλημα της ταχείας διάσπασης των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Έχει λοιπόν παρατηρηθεί σε διάφορες γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές πως η διάσπαση των καρβαμιδικών, ένα εκ των οποίων είναι και το carbofuran, είναι ταχύτερη από ότι σε άλλα εδάφη, με το χρόνο ημιζωής τους να παρουσιάζει μείωση τέτοια ώστε να επηρεάζεται η βιολογική τους δράση. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην αποδόμηση των καρβαμιδικών ενώσεων από μικροοργανισμούς που έχουν προσαρμοστεί στην παρουσία τους και έχουν αναπτύξει τα γενετικά πλεονεκτήματα ώστε να αποδομούν τις ενώσεις και στη συνέχεια να τις χρησιμοποιούν ως πηγή C και N. Αποτέλεσμα είναι η ανάγκη του προσδιορισμού και της εκτενούς μελέτης της ύπαρξης και αφθονίας των καταβολικών γονιδίων που σχετίζονται με το φαινόμενο

αυτό καθώς και η διερεύνηση των συσχετισμών της αφθονίας των καταβολικών αυτών γονιδίων με ένα πλήθος φυτοπροστατευτικών ουσιών.

1.2 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα διακρίνονται με κριτήριο το είδος του εχθρού που καταπολεμούν, τον τρόπο δράσης τους, την τοξικότητα τους, τη χημική δομή τους και τον τρόπο παρασκευής-σύνθεσης τους. Ανάλογα με το είδος του εχθρού ταξινομούνται σε ακαρεοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και νηματωδοκτόνα. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε επαφής (παραμένουν στην επιφάνεια του φυτού), διασυστηματικά (εισέρχονται και κυκλοφορούν μέσα στους φυτικούς ιστούς), συμπλασματικά και αποπ्लाστικά (European Commission, 2007). Οι φυτοπροστατευτικές ουσίες μπορούν να είναι συνθετικές χημικές ενώσεις (ανόργανες και οργανικές) ή φυσικής προέλευσης (βιολογικά γεωργικά φάρμακα-biopesticides) δηλαδή προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού φυτών, μικροοργανισμών και εντόμων.

Κύριες χημικές ομάδες κατηγοριοποίησης είναι τα

- Οργανοχλωριωμένα
- Οργανοφωσφορικά
- Καρβαμικά
- Διθειοκαρβαμικά
- Πυρεθρινοειδή
- Νεονικοτινοειδή
- Φαινυλαμίδια
- Τριαζίνες
- Ανιλινοπυριμιδίνες
- Ανιλιδοπυριμιδίνες
- Αζόλες
- Παράγωγα ουρίας

1.3 Τύχη φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Μετά την εφαρμογή μίας φυτοπροστατευτικής ουσίας, εκτός της ποσότητας που θα βρει τον επιθυμητό στόχο, η μεγαλύτερη ποσότητα του αρχικού διαλύματός της θα έχει διαφορετική τύχη. Το μέρος της ποσότητας που θα καταλήξει στο έδαφος θα λάβει μέρος σε διάφορες διεργασίες όπως:

- Έκπλυση (Leaching) κατά την οποία μπορεί να μετακινηθεί με το νερό προς τα βαθύτερα στρώματα και να καταλήξει στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα.

- Επιφανειακή απορροή (Run-off) όπου μπορεί να μετακινηθεί σε επιφανειακά υδροφόρα συστήματα μέσω του νερού της άρδευσης ή της βροχής.
- Πτητικοποίηση ώστε να διαφύγει, με τη μορφή ατμών από την επιφάνεια του εδάφους, των φυτών ή και του νερού.

1.4 Αποδόμηση-Διάσπαση φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Η τύχη και η συμπεριφορά των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο έδαφος ελέγχεται από χημικές, βιολογικές και φυσικές διεργασίες. Έτσι αυτά μπορεί να δεσμευτούν (προσρόφηση) στα ανόργανα και οργανικά κολλοειδή του εδάφους ή να αποδομηθούν με τη δράση αβιοτικών ή βιοτικών μηχανισμών.

1.4.1 Αβιοτική διάσπαση

Περιλαμβάνει όλες εκείνες τις διεργασίες, όπως την οξείδωση του ξενοβιοτικού μορίου, την υδρόλυση, την φωτοχημική διάσπασή του στην επιφάνεια του εδάφους που είναι υπεύθυνες για την διάσπαση του δραστικού μορίου σε απλούστερα. Οι διεργασίες αυτές εξαρτώνται από το pH, τα φυσικά χαρακτηριστικά του εδάφους καθώς και τις εκάστοτε καιρικές συνθήκες.

1.4.2 Βιοτική αποδόμηση

Η βιοαποδόμηση είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την διάσπαση ξενοβιοτικών ουσιών (ανάμεσα τους και οι φυτοπροστατευτικές ουσίες) σε εδάφη και υπόγεια νερά, με βιολογικούς μηχανισμούς όπως είναι οι μικροοργανισμοί (βακτήρια και μύκητες) σε απλούστερα προϊόντα, λιγότερο τοξικά στις περισσότερες περιπτώσεις. Αυτό βέβαια προϋποθέτει την ύπαρξη μικροβιακού πληθυσμού ικανού να χρησιμοποιήσει την φυτοπροστατευτική ουσία ως πηγή θρεπτικών συστατικών με σκοπό την αύξηση και ανάπτυξή του (Felsot and Shelton, 1993). Η μικροβιακή διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα διαμέσου μεταβολικών διεργασιών όπως ανοργανοποίηση, συμμεταβολισμός, πολυμερισμός, συμπλοκοποίηση και συσώρευση, είτε έμμεσα μέσα από επιδράσεις της μικροβιακής δραστηριότητας που μεταβάλλουν το pH και ενεργοποιούν νέες οξειδοαναγωγικές διεργασίες. Η βιοαποδόμηση επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζει και τη μικροβιακή ανάπτυξη όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, η παρουσία ανταγωνιστών, το pH κ.α.

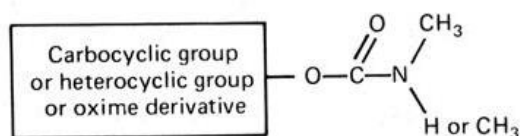
1.4.2.1 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης φυτοπροστατευτικών ουσιών και μικροοργανισμών (Racke & Coats, 1988). Είναι η διαδικασία κατά την οποία μικροοργανισμοί του εδάφους μεταβολίζουν με πολύ ταχείς ρυθμούς φυτοπροστατευτικές ουσίες και συνήθως παρατηρείται μετά από την επανειλημμένη εφαρμογή της ίδιας φυτοπροστατευτικής ουσίας στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών (Charman & Harris, 1990). Τελικό αποτέλεσμα είναι η σταδιακή προσαρμογή των ενζυμικών συστημάτων των μικροοργανισμών του εδάφους στην αποδόμηση της φυτοπροστατευτικής ουσίας, στην οποία μπορεί να συμμετέχουν δύο ή και περισσότεροι μικροοργανισμοί (Read, 1986). Η μικροβιακή αυτή προσαρμογή επηρεάζεται από κάθε περιβαλλοντικό παράγοντα που επηρεάζει και τη μικροβιακή ανάπτυξη όπως προαναφέρθηκε. Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση μιας φυτοπροστατευτικής ουσίας στο έδαφος χαρακτηρίζεται συνήθως από δύο φάσεις. Πρώτα την φάση υστέρησης (lag phase) η οποία παρατηρείται αμέσως μετά την εφαρμογή της ουσίας στο έδαφος και αποτελεί την φάσης βραδείας αποδόμησης, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η δεύτερη φάση της ταχείας αποδόμησης. Αρχικά η επιταχυνόμενη αποδόμηση θεωρήθηκε ευεργετική διεργασία που οδηγεί στην ταχύτατη μείωση των ανεπιθύμητων υπολειμμάτων των εφαρμοζόμενων φυτοπροστατευτικών ουσιών, με αποτέλεσμα την μείωση της πιθανότητας μετακίνησής τους στα υπόγεια και επιφανειακά νερά (Felsot, 1989). Αλλά τελικά έγινε φανερό πως στην ακραία του μορφή, το φαινόμενο αυτό, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, λόγω της ταχύτατης μείωσης της συγκέντρωσής τους σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται για την έκφραση της βιολογικής τους δράσης (Karpouzas et al., 2001). Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως την αρχική συγκέντρωση της ουσίας που εφαρμόζεται, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, καθώς και το ιστορικό χρήσης των εδαφών με άλλες φυτοπροστατευτικές ουσίες με παρόμοια χημική δομή, ένα φαινόμενο που έχει ονομαστεί διασταυρούμενη επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση. Για παράδειγμα προηγούμενες μελέτες με το carbofuran έδειξαν ότι η εφαρμογή του carbofuran σε συγκεντρώσεις ως και 0.1 mg Kg^{-1} που αναλογούν σε συγκεντρώσεις υπολειμμάτων διασκορπισμένα/μεταφερόμενα από ένα ψεκαστικό νέφος, είναι επαρκή για την εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης για επόμενες εφαρμογές του carbofuran (Karpouzas et al., 2001). Ταυτόχρονα, έχει παρατηρηθεί χαρακτηριστική διαφορά, όσο αφορά στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση, ανάμεσα σε εδάφη από διαφορετικές γεωγραφικές θέσεις. Όπως επισημαίνεται από τους Karpouzas et al., (1999) μετά την εφαρμογή του carbofuran σε εδάφη από την Ελλάδα και το Ηνωμένο Βασίλειο όπου υπήρχαν σαφείς διαφορές, με τα πρώτα να παρουσιάζουν επιταχυμένο ρυθμό διάσπασης μέχρι και για 18 μήνες, ενώ τα δεύτερα μέχρι και για 4 χρόνια. Το φαινόμενο της

επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης έχει παρατηρηθεί και σε εδάφη με απουσία πρότερης χρήσης carbofuran αλλά χρήσης άλλης ουσίας δομικά συγγενούς. Όπως έχει αναφερθεί, παραδείγματος χάριν, από τους Chapalamadugu & Chaudhry, (1991) καταγράφηκε επιταχυμένος ρυθμός διάσπασης του carbofuran μετά από την χρόνια χρήση oxamyl λόγω διασταυρούμενης προσαρμογής, καθώς και μετά από επί τριακονταετία χρήση EPTC (Karpouzas et al., 1999).

1.5 Καρβαμικά – Carbamates

Τα καρβαμικά γεωργικά φάρμακα είναι εστέρες του καρβαμικού οξέος και η χημική τους δομή βασίστηκε στο μόριο της φυσοστιγμίνης (physostigmine). Ο γενικός τους τύπος τους παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Ο γενικός τύπος των καρβαμικών ενώσεων

Γενικά είναι ασταθείς ενώσεις ειδικά υπό αλκαλικές συνθήκες και υπόκεινται σε αποδόμηση με αποτέλεσμα το σχηματισμό μητρικής αλκοόλης (parent alcohol), φαινόλης, αμμωνίας, αμινών και CO₂.

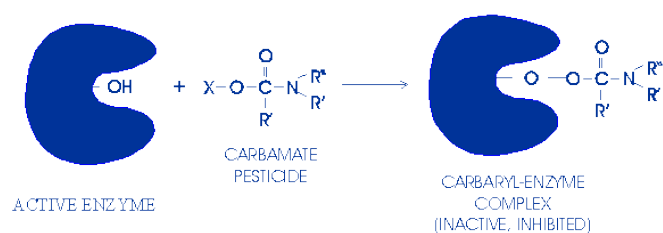
Τα άλατα και οι εστέρες των υποκατεστημένων καρβαμικών οξέων είναι πιο σταθερά από τα καρβαμικά οξέα. Αυτή η αυξημένη σταθερότητα που αποκτάται είναι η βάση για τη σύνθεση πολλών από τα παράγωγα που είναι βιολογικά ενεργά και χρησιμοποιούνται ως φυτοπροστατευτικές ουσίες. Τα καρβαμικά αυτά παράγωγα είναι κρυσταλλικά στερεά με σχετικά χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Έχουν μέτρια διαλυτότητα σε διαλύτες όπως ξυλένιο, χλωροφόρμιο και διχλωρομεθάνιο. Σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες γενικά έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα, αλλά υψηλή διαλυτότητα σε πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη και διμεθυλφορμαμίδιο.

1.5.1 Τρόπος δράσης καρβαμικών

Γενικά τα καρβαμικά αναστέλλουν εστεράσες που έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο όπως η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Παρόλο που η αναστολή αυτή δεν

είναι αρκετή ώστε οι καρβαμιδικές ενώσεις να θεωρηθούν σημαντικά τοξικές – εκτός από την περίπτωση της AChE - συμβάλουν μετά από μακροχρόνια και χαμηλών επιπέδων έκθεση, στην ενίσχυση της τοξικότητας άλλων ενώσεων (Sakai & Matsumura, 1968, 1971; Aldridge & Magos, 1978).

Ως φυτοπροστατευτικές ουσίες δρουν σαν αναστολείς της AChE. Όταν η δράση της AChE αναστέλλεται από έναν καρβαμιδικό εστέρα δεν μπορεί πια να υδρολύσει την ακετυλοχολίνη σε χολίνη και ακετικό οξύ, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της ACh παραμένει υψηλή στη σύναψη προκαλώντας συνεχόμενη διέγερση του μυ, εξάντληση, και σε υψηλές συγκεντρώσεις αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο. Η θέση καρβαμυλίωσης του ενζύμου είναι το υδροξύλιο του αμινοξέος της σερίνης. Ο ρυθμός της αναγέννησης του καρβαμιλωμένου ενζύμου προς AChE είναι σχετικά γρήγορος σε σύγκριση με την αναστολή του από τα οργανοφωσφορικά (Reiner & Aldridge, 1967; Reiner, 1971). Και αυτό γιατί για τη δράση των καρβαμιδικών τον κύριο ρόλο παίζει η στερεοχημική τους δομή. Όσο περισσότερο προσομοιάζει το μόριο του καρβαμιδικού με το μόριο της ACh τόσο καλύτερη είναι και η δράση του, αν και πάντα παραμένει αντιστρεπτή και ασταθής. Ο χρόνος αυθόρμητης επανενεργοποίησης των καρβαμιλωμένων ChEs ποικίλει, στην AChE σε pH 7.0 – 7.4 και 25 °C, εκφραζόμενη ως ημιζωή, κυμαίνεται από 2 ως 240 min (Reiner, 1971). Έτσι είναι φανερό πως η έκθεση του ανθρώπου στις καρβαμιδικές φυτοπροστατευτικές ουσίες είναι λιγότερο επικίνδυνη από την έκθεσή του σε άλλες αντίστοιχες ομάδες φυτοπροστατευτικών ουσιών, όπως τα οργανοφωσφορικά, επειδή η αναλογία μεταξύ της θανάσιμης δόσης και της δόσης που απαιτείται για την παραγωγή ελάχιστου συμπτώματος δηλητηρίασης είναι, σε γενικές γραμμές, σημαντικά μεγαλύτερη από αυτήν των οργανοφωσφορικών ενώσεων (Goldberg et al., 1963, Vandekar, 1965, Vandekar et al., 1971).

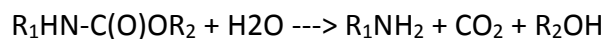


Εικόνα 2. Αναστολή του ενζύμου AChE από καρβαμιδική ένωση

Τα καρβαμιδικά παράγωγα, που έχουν βιολογική δράση, παρουσιάζουν διαφορετικό χρόνο ημιζωής και είναι, αντιστοίχως, περισσότερο ή λιγότερο σταθερά σαν μόρια.

1.5.2 Διάσπαση καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ουσιών

Η διάσπαση των καρβαμιδικών πραγματοποιείται με τη συμβολή αβιοτικών καθώς και βιοτικών παραγόντων. Μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών ικανών να αποδομούν τα καρβαμιδικά έχει καταγραφεί (Mulbery & Eaton, 1991). Στο έδαφος, η κυρίαρχη μεταβολική οδός είναι η υδρόλυση του καρβαμιδικού δεσμού (Feng et al., 1971). Αυτό συμβαίνει αυθόρμητα με την δράση εστερασών σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση



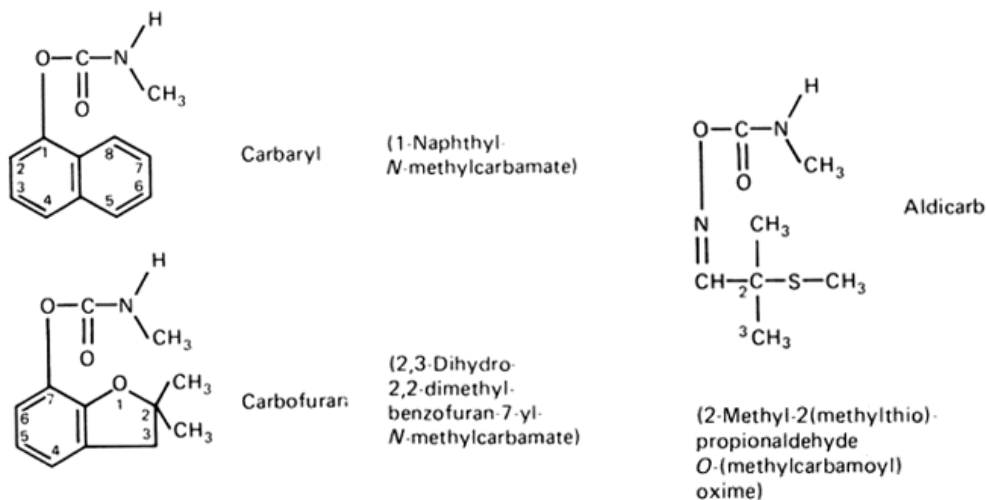
Ο μηχανισμός της υδρόλυσης είναι διαφορετικός σε N-μεθυλο και N-διμέθυλο καρβαμιδικά και ο ρυθμός της υδρόλωσης των καρβαμιδικών από εστεράσες διαφέρει ανάλογα με την εστεράση και τη δομή του καρβαμιδικού. Τελικό αποτέλεσμα της διάσπασης είναι μεταβολίτες περισσότερο υδατοδιαλυτοί και συνήθως λιγότερο τοξικοί.

Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα μπορούν να ενταχθούν σε τρεις υπο-ομάδες.

A) Αρυλ N-μεθυλοκαρβαμικούς εστέρες φαινολών όπως το carbaryl.

B) Οξυ και θειουδρόξυ παράγωγα αλδεϋδών όπως το aldicarb.

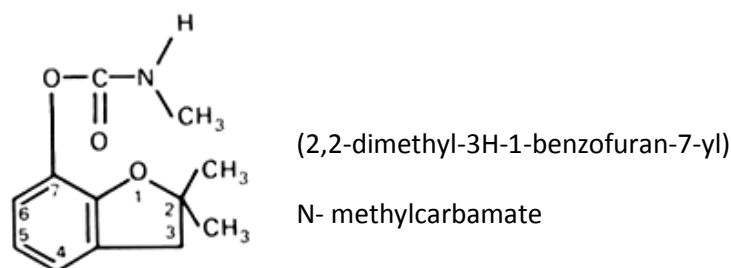
Γ) N-μεθυλο και N-διμεθυλοκαρβαμιδικούς εστέρες ετεροκυκλικών φαινολών όπως το carbofuran.



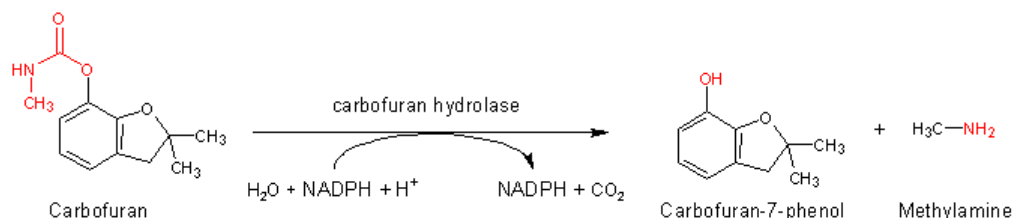
1.6 Carbofuran

Το carbofuran είναι ευρέως φάσματος δράσης διασυστηματικό εντομοκτόνο και νηματοτοδοκτόνο επαφής και στομάχου. Η κυκλοφορία του άρχισε το 1967 και βάση της απόφασης 2007/416/ΕΚ/13.6.2007 της αρμόδιας επιτροπής της Ευρωπαϊκής ένωσης πραγματοποιήθηκε ανάκληση της έγκρισης του στις 13/12/2007 στην Ελλάδα, με καταληκτική διορία εξαντλήσεως των αποθεμάτων του τις 13/12/2008 .

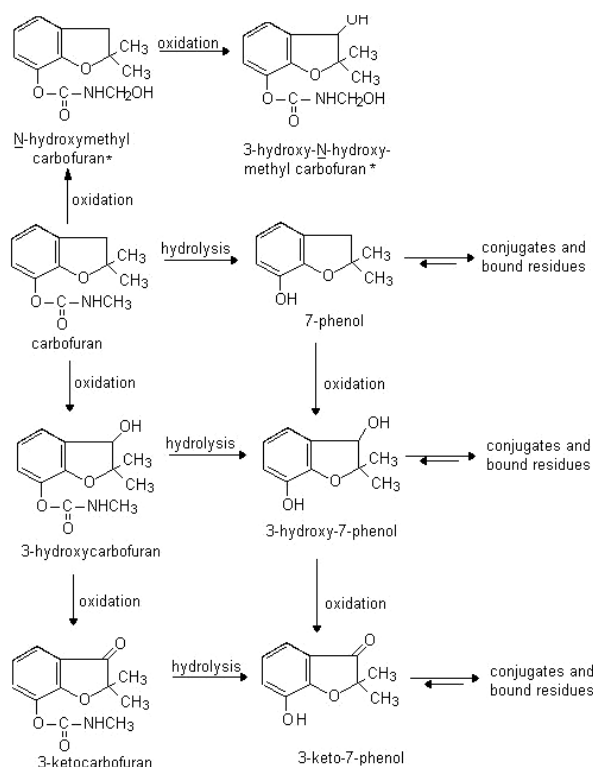
Ο χημικός τύπος του carbofuran είναι $C_{12}H_{15}NO_3$



Το carbofuran όπως όλα τα καρβαμιδικά είναι αναστολέας της AChE. Στο έδαφος αναμένεται να έχει υψηλή έως πολύ υψηλή κινητικότητα όπως φαίνεται και από τις χαμηλές τιμές του συντελεστή προσρόφησης $K_{oc} = 7,3$ έως 123 g/ml. Το carbofuran δεν είναι ιδιαίτερα πτητικό. Ο χρόνος ημιζωής (DT_{50}) του carbofuran παρουσιάζει μεγάλο εύρος με τους Chin Pampillo et al., (2014) να καταγράφουν DT_{50} από 5.9 ως 29.9 ημέρες. Το carbofuran φαίνεται να είναι σημαντικά πιο σταθερό σε όξινες συνθήκες ($pH < 5.4$) και η διάσπασή του είναι πολύ πιο περιορισμένη (Karpouzas & Walker, 1999) ενώ είναι αρκετά ασταθές σε υψηλότερα pH. Σε εδάφη με ιστορικό πρότερης εφαρμογής carbofuran ή και άλλων εντομοκτόνων αποδομείται ταχύτερα (Pampillo et al., 2014; Karpouzas & Walker, 1999). Ο μεταβολισμός του ακολουθεί τουλάχιστον τρία διαφορετικά μονοπάτια αρχίζοντας με την υδρόλυση του μεθυλοκαρβαμιδικού δεσμού, που ελέγχεται από μία υδρολάση, με το συγκεκριμένο μεταβολικό βήμα να ευθύνεται για την απώλεια της αποτελεσματικότητάς του (Hayatsu & Nagata, 1993)



Τελικοί μεταβολίτες της διάσπασης του carbofuran που έχουν παρατηρηθεί είναι τα 3-hydroxy-carbofuran, 3-keto-carbofuran, 3-hydroxy-7-phenol, carbofuran 7-phenol.



Όπως φαίνεται η βακτηριακή αποδόμηση οδηγεί συνήθως στο σχηματισμό του carbofuran-7-phenol και μεθυλαμίνης που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια ως πηγή N και C. Έχουν απομονωθεί πολλά βακτήρια και ένζυμά που αποδομούν το carbofuran και ανήκουν στα γένη *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* (Chauldry et al.1988; Feng et al.,1997), *Moraxella*, *Microbacterium*, *Paenobacillus*, *Staphylococcus*, *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Bacteroides* (Karpouzas & Walker, 2000) και *Achromobacter sp.* (Karns et al., 1986) .

1.7 Mcd γονίδιο

Το πρώτο ένζυμο μικροβιακής προέλευσης με την ικανότητα να διασπά N-μεθυλοκαρβαμδικές ενώσεις απομονώθηκε από το στέλεχος *Achromobacter sp.* WM111. Χαρακτηρίστηκε ως υδρολάση του carbofuran (MCD) και κωδικοποιούνταν από το αντίστοιχο γονίδιο *mcd*. Το στέλεχος αυτό είχε την ικανότητα να υδρολύει το καρβαμδικό δεσμό του carbofuran σε εξαιρετικά γρήγορο ρυθμό, χρησιμοποιώντας το άζωτο της N-μεθυλοκαρβαμδικής πλευρικής αλυσίδας ως πηγή ενέργειας

(Tomasek & Karns, 1989). Το *mcd* γονίδιο εντοπίστηκε στο πλασμίδιο pPDL11 μεγέθους 100kb. Η υδρολάση που κωδικοποιείται είναι διμερής, Mn^{2+} - εξαρτώμενη, και οι δύο υπομονάδες της έχουν μοριακό βάρος 77 και 72kDa (Tomasek & Karns, 1989). Το *mcd* γονίδιο έχει αποδειχθεί από τους Desaint et al., (2003) ότι μπορεί να διασπαρεί μεταξύ των μελών της μικροβιακής κοινότητας τους εδάφους με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά. Η ικανότητα οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς του *mcd* είναι υπεύθυνη για την ύπαρξη της μεγάλης φυλογενετικής ποικιλότητας μεταξύ των μικροοργανισμών που μπορούν να αποδομήσουν το carbofuran. Έτσι δικαιολογείται και ο εντοπισμός πολύ παρόμοιων καταβολικών πλασμιδίων σε βακτήρια μη σχετιζόμενα φυλογενετικά στα οποία εντοπίστηκε ένα θραύσμα 590 bp του *mcd* γονιδίου (Parekh et al., 1996). Παρότι το *mcd* γονίδιο μεταφέρεται σε διάφορα βακτήρια με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά, όταν επιχειρήθηκε να εκφραστεί από τους (Tomasek & Karns 1989) σε κύτταρα *Alcaligenes eutrophus*, *Acinetobacter calcoaticus*, *Achromobacter pestifer* είχε σαν αποτέλεσμα πολύ χαμηλή απόδοση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Αλλά και εκφρασμένο σε κύτταρα *P.putida* η παραγωγή του ενζύμου ανιχνεύτηκε σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από αυτά του αγρίου τύπου WM111.

1.8 Στόχοι της παρούσας εργασίας

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσουμε τον ρόλο του γονιδίου *mcd* στην αποδόμηση καρβαμικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε περιοχή μονοκαλλιέργειας πατάτας (περιοχή Λασιθίου) με ιστορικό χρήσης καρβαμικών εντομοκτόνων, νηματωδοκτόνων, ζιζανιοκτόνων και μυκητοκτόνων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγμα Εδάφους

Το δείγμα εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη συλλέχθηκε από το οροπέδιο του Λασιθίου Κρήτης. Η συλλογή έγινε από μονοκαλλιέργεια πατάτας όπου υπάρχει ιστορικό χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων και ειδικότερα χρήση του καρβαμιδικού νηματωδοκτόνου oxamyl. Αντίθετα η χρήση του carbofuran είχε διακοπεί από το 2005. Το pH του εδάφους ήταν 6.4.

2.2 Διαλύτες και γεωργικά φάρμακα

Για όλες τις αναλυτικές πρακτικές χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και H₂O HPLC grade (Merck Cmbh, Germany) και πρότυπη ουσία carbofuran καθαρότητας 99,9% (Sigma Aldrich).

2.3 Πειραματικός Σχεδιασμός

Δύο δείγματα από το συγκεκριμένο έδαφος (200 g ξηρό βάρος) διαχωρίστηκαν αρχικά. Το ένα δέχτηκε εφαρμογή κατάλληλης ποσότητας υδατικού διαλύματος carbofuran ώστε στο έδαφος να έχουμε τελική συγκέντρωση carbofuran 5mg/Kg ξηρού βάρους εδάφους. Αντίθετα, το δεύτερο δείγμα δέχτηκε την ίδια ποσότητα νερού χωρίς carbofuran και χαρακτηρίστηκε ως δείγμα “μάρτυρας”. Αμέσως μετά την εφαρμογή του carbofuran ακολούθησε ανάμιξη με το χέρι και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού ώστε να προσαρμοστεί η υγρασία του εδάφους στο 40% της υδατοχωρητικότητας. Τα δύο δείγματα εδάφους στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε υπο-δείγματα των 12g που τοποθετήθηκαν σε σακουλάκια έτσι ώστε να εξασφαλίζονται αερόβιες συνθήκες και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης όπου και διατηρήθηκαν στους 25° C. Πριν την εφαρμογή καθώς και 3, 7, 14, 28 ημέρες, 3 δείγματα από κάθε μεταχείριση συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν στους -20° C μέχρι την χρήση τους για εκχύλιση του carbofuran και εξαγωγή DNA.

Η εργασία έχει δύο μέρη: α) το αναλυτικό μέρος όπου έγινε προσδιορισμός του carbofuran στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή του εντομοκτόνου μετά από εκχύλισή και ανάλυση σε σύστημα HPLC, ώστε να προσδιοριστεί η πορεία αποδόμησης του στο έδαφος και β) το μικροβιολογικό μέρος όπου προσδιορίστηκε η αφθονία του γονιδίου *mcd* αλλά και του 16S rRNA των ολικών βακτηρίων, μετά από εκχύλιση του DNA του εδάφους και πραγματοποίηση PCR πραγματικού χρόνου.

2.4 Εκχύλιση και προσδιορισμός των υπολειμμάτων του carbofuran στο έδαφος

2.4.1 Εκχύλιση του carbofuran από το έδαφος

Αρχικά ποσότητα 10g εδάφους ζυγίστηκε σε κωνικές φιάλες των 100 mL και προστέθηκαν 20 mL μείγματος ακετονιτριλίου (ACN) - νερού HPLC grade (Merck GmbH, Germany) σε αναλογία 50 % ACN : 50 % H₂O κατ'όγκο. Οι φιάλες ανακινήθηκαν για 2 ώρες σε δυνατή ταχύτητα σε οριζόντιο αναδευτήρα. Μετά την ανάδευση το περιεχόμενο φυγοκεντρήθηκε για 5 min στα 7500rpm. Στη συνέχεια το υπερκείμενο συλλέχθηκε και διηθήθηκε από φίλτρο Whatman 0,45μm και το διήθημα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια HPLC για ανάλυση σε σύστημα HPLC. Η μέθοδος εκχύλισης που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε ως προς την επαναληψιμότητα και ακρίβεια της σε τρία επίπεδα, 0.1, 1 και 5 μg carbofuran/g εδάφους, με τρεις επαναλήψεις για το κάθε επίπεδο και έδειξε επίπεδα ανάκτησης >85%.

2.4.2 Χρωματογραφικός προσδιορισμός του carbofuran

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του carbofuran έγινε με τη χρήση συστήματος HPLC Shimadzu Prominence Modular με ανιχνευτή φωτοδιόδων (PDA). Ο διαχωρισμός του carbofuran πραγματοποιήθηκε σε στήλη RP-C18 CTO-10ASVP με κινητή φάση 40 % ACN και 60% H₂O και ροή 1mL/min. Η ανίχνευση του carbofuran πραγματοποιήθηκε στα 215 nm.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του carbofuran πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό, αρχικά παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1000 μg/mL carbofuran σε μεθανόλη. Από το αρχικό αυτό διάλυμα με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 5, 2, 1, 0.5, 0.1 και 0.05 μg/mL. Ακολούθησε έκχυση 10μL από το κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε σε κάθε ένα από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του carbofuran και κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του εμβαδού των κορυφών τους με την βοήθεια του λογισμικού CLASS-Agent Data Management Software.

2.5 Προσδιορισμός της αφθονίας των γονιδίων *mcd* και 16S rRNA

2.5.1 Εκχύλιση DNA από το έδαφος

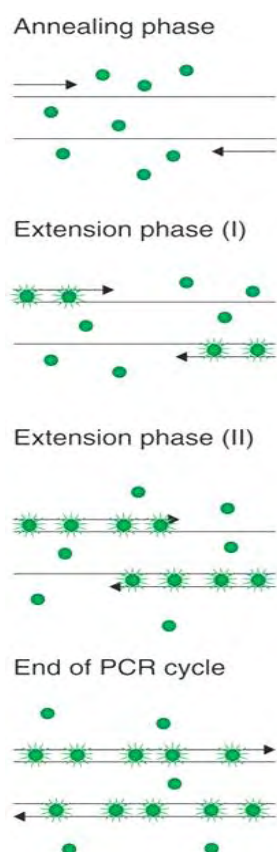
Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση DNA από τα δείγματα εδάφους είναι δύο: η μέθοδος άμεσης λύσης (Ogram et al., 1987) και η μέθοδος της απομόνωσης κυττάρων (Torsvik, 1980). Στην μέθοδο άμεσης λύσης γίνεται άμεση λύση των κυττάρων στο έδαφος. Αυτό συμβαίνει με χημικό, ενζυμικό ή μηχανικό τρόπο, είτε και με συνδυασμό των μεθόδων αυτών. Μετά τη λύση των κυττάρων ακολουθεί η εκχύλιση του DNA και καθαρισμός του. Στη μέθοδο της απομόνωσης κυττάρων γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων από τα σωματίδια του εδάφους πριν τη λύση των κυττάρων και την ανάκτηση του DNA. Επειδή σκοπός της εκχύλισης του DNA είναι η περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση του με μοριακές τεχνικές - όπως η PCR πραγματικού χρόνου στην παρούσα εργασία - είναι απαραίτητο το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων χουμικών οξέων, πολυζακχαριδίων και πρωτεϊνών ώστε να αποφευχθεί αναστολή της δράσης της πολυμεράσης. Η βασική διαφορά των δύο μεθόδων είναι πως με την μέθοδο της άμεσης λύσης παραλαμβάνεται συνήθως μεγαλύτερη ποσότητα DNA, ενώ με τη μέθοδο απομόνωσης κυττάρων παραλαμβάνεται μικρότερη ποσότητα DNA αλλά υψηλότερης καθαρότητας και μεγαλύτερου μοριακού βάρους. (Gabor et al., 2003, Robe et al., 2003, Roose-Amsaleg et al., 2001). Πολλά kit εκχύλισης DNA είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, βασισμένα και στις δύο αυτές μεθόδους, ώστε να μπορεί να γίνει επιλογή βάσει των εκάστοτε πειραματικών αναγκών που προκύπτουν.

Στην συγκεκριμένη εργασία η εκχύλιση DNA από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της άμεσης λύσης και με συνδυασμό μηχανικών και χημικών μεθόδων με το εμπορικό kit Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Σε κάθε περίπτωση για την εξαγωγή DNA χρησιμοποιήθηκε ποσότητα εδάφους 0,5g. Για να διαπιστωθεί η ποιότητα και η ποσότητα του DNA που παραλήφθηκε από κάθε έδαφος έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8%. Η πηκτή παρασκευάστηκε διαλύοντας με βρασμό κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε 1x TAE (Tris-acetate-EDTA 50x : 242 g Tris Base, 57.1 ml οξικό οξύ, 100 ml EDTA -0.5M, pH 8- σε 1 L dH₂O). Στο διάλυμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο με τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Μετά τη στερεοποίηση του διαλύματος, η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 1x TAE και φορτώθηκαν 10μL δείγματος αναμεμειγμένα με 2μL διάλυμα φόρτωσης (loading buffer: 5 ml γλυκερόλη, 1 ml Bromophenol blue, 0.5 ml 20x TAE και 3.5 ml ddH₂O). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100V. Τα δεδομένα λήφθηκαν μετά από έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η ακριβής εκτίμηση της ποσότητας

του DNA που εκχυλίστηκε πραγματοποιήθηκε στο φθορισμόμετρο Qubit χρησιμοποιώντας το Qubit dsDNA BR Assay Kit, Invitrogen.

2.5.2 Εκτίμηση της αφθονίας των γονιδίων *mcd* και 16s rRNA στο έδαφος με PCR πραγματικού χρόνου

Η PCR πραγματικού χρόνου είναι ποσοτική μέθοδος και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της αφθονίας του *mcd* γονιδίου. Παράλληλα έγινε ποσοτικοποίηση και του συνολικού αριθμού των βακτηρίων (με ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου) ώστε να διαπιστωθεί αν η όποια αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *mcd* οφείλεται σε συνολική αύξηση της βακτηριακής κοινότητας και όχι τελικά σε αύξηση της ομάδας μικροοργανισμών που έχουν προσαρμοστεί στην παρουσία του και έχουν αναπτύξει γενετικούς μηχανισμούς ώστε να το αποδομούν. Αυτό πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου του 16s rRNA και υπολογισμό του λόγου *mcd*/16s rRNA ώστε να βρεθεί η σχετική αφθονία του *mcd*.



Εικόνα 3. Πρόσδεση και φθορισμός της χρωστικής Syber Green στις φάσεις των κύκλων της Real-Time PCR.

Στην PCR πραγματικού χρόνου η συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης ελέγχεται στο τέλος κάθε κύκλου με την χρήση χρωστικών που μετά από διέγερση φθορίζουν. Η χρωστική που επιλέχθηκε εδώ είναι η SYBR Green. Η χρωστική προσδένεται στα προϊόντα ενίσχυσης μη ειδικά και χωρίς να προκαλεί κάποια αλλοίωση ώστε η ενίσχυση τους να συνεχιστεί και στους επόμενους κύκλους. Όταν η χρωστική παρεμβληθεί στην διπλή έλικα εκπέμπει φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας σχετίζεται με τη συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης στο συγκεκριμένο χρόνο. Επειδή η πρόσδεση είναι μη ειδική, η χρωστική ενδέχεται να δεσμευτεί σε δίκλωνο τμήμα DNA-μη στόχο. Επομένως είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός του φθορισμού που εκπέμπεται από το μόριο-στόχο από εκείνον των άλλων δίκλωνων τμημάτων DNA που τυχόν υπάρχουν στο διάλυμα. Για το λόγο αυτό μετά την ολοκλήρωση της ενίσχυσης είναι απαραίτητη η ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (dissociation curve). Η καμπύλη αποδιάταξης δίνει τη δυνατότητα

διαχωρισμού του φθορισμού που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από εκείνους τους φθορισμούς που οφείλονται σε διμερή εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από

την PCR πραγματικού χρόνου καταγράφονται με τη μορφή γραφημάτων, ως καμπύλες ενίσχυσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτικοποίηση των αρχικών ποσοτήτων DNA με ακρίβεια. Η καμπύλη ενίσχυσης χωρίζεται σε 4 φάσεις: α) η φάση όπου τα επίπεδα του ενδογενή φθορισμού (background fluorescence) είναι υψηλότερα από τα επίπεδα του φθορισμού που προέρχεται από τα προϊόντα των πρώτων κύκλων της PCR, β) η εκθετική φάση (exponential) όπου η ποσότητα των συντιθέμενων προϊόντων είναι ανάλογη της αρχικής ποσότητας και κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης γίνεται η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων, γ) η γραμμική φάση (linear) όπου παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων του γονιδίου-στόχου λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων δ) φάση κορεσμού (plateau) η αντίδραση και παραγωγή νέων αντιγράφων έχει ολοκληρωθεί λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων. Ο προσδιορισμός της ποσότητας των προϊόντων γίνεται με απόλυτη ή σχετική ποσοτικοποίηση. Για την ποσοτικοποίηση πρέπει να έχει τεθεί αναλόγως και η τιμή Ct. Ως τιμή Ct ορίζεται ο κύκλος κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού ξεπερνά μια τιμή-κατώφλι (threshold) και η ενίσχυση των προϊόντων περνά στην εκθετική φάση αύξησης. Γενικά όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση του γονιδίου στόχου τόσο μικρότερη είναι η τιμή Ct που τίθεται. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση, που έχει χρησιμοποιηθεί στην εργασία, για να προσδιοριστεί ο αριθμός των αντιγράφων του αρχικού δείγματος κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με ενίσχυση του γονιδίου-στόχου από διαδοχικές αραιώσεις ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης.

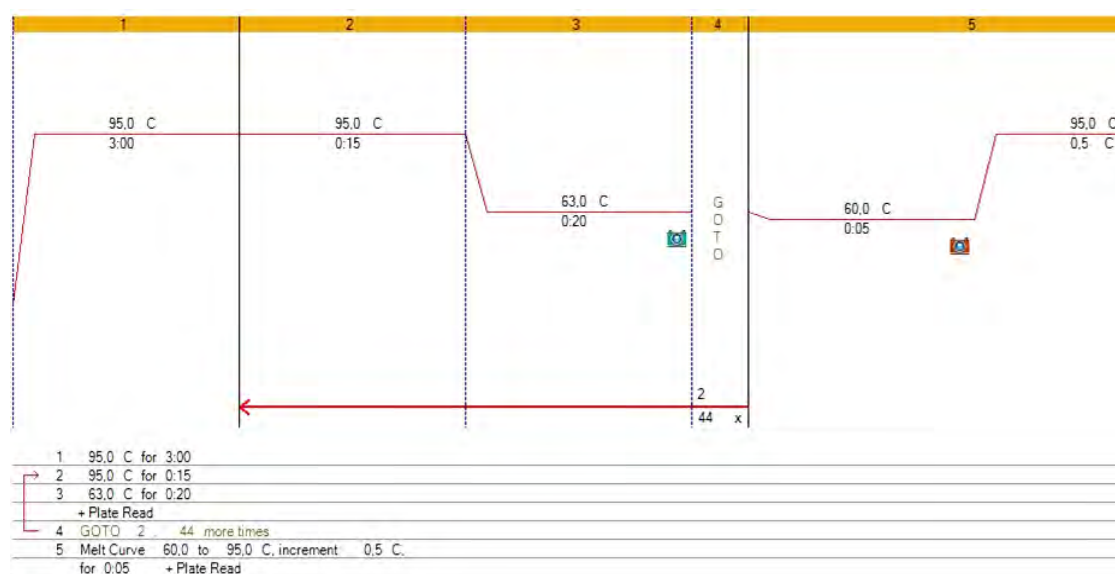
PCR πραγματικού χρόνου γονίδιο *mcd*: Τα ζευγάρια των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του *mcd* γονιδίου καθώς και οι συνθήκες πραγματοποίησης των αντιδράσεων της PCR πραγματικού χρόνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Ειδικότερα για το γονίδιο *mcd* οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία GenBank: AF160188.1 (complete coding region) *Achromobacter* sp. WM111 plasmid pDL11 carbofuran hydrolase και οδηγούσε στην ενίσχυση ενός τμήματος 168 bp. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR πραγματικού χρόνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Bio-Rad CFX Connect Real-Time System. Μετά το τέλος της φάσης ενίσχυσης ακολούθησε η φάση της αποδιάταξης για την κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης.

Πίνακας 1. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και εκτίμηση της αφθονίας το γονιδίου *mcd* με PCR πραγματικού χρόνου.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5' - 3')
mcdF_rtpcr	CACGCACTTCTTCAGAGATCAC
mcdR_rtpcr	GCGAAATGATGCCAATAGACCG

Πίνακας 2. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του *mcd* γονιδίου στα δείγματα εδάφους με PCR πραγματικού χρόνου.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10μL	1x
Forward primer (20pmol/μl)	0.2μL	0.2pmol/μL
Reverse primer (20pmol/μl)	0.2μL	0.2μM
BSA (20μg/μl)	0.4μL	400ng/μL
DNA (4ng/reaction)	5μL	20ng
ddH ₂ O	4.2μL	<10
Συνολικός όγκος	20μL	



Εικόνα 4. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR πραγματικού χρόνου για την ενίσχυση του *mcd* γονιδίου.

PCR πραγματικού χρόνου γονίδιο 16S rRNA: Η εκτίμηση του πληθυσμού των βακτηρίων στο έδαφος πραγματοποιήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 (Fierer et al. 2005). Το συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών ενισχύει ένα τμήμα 180 bp. Τα

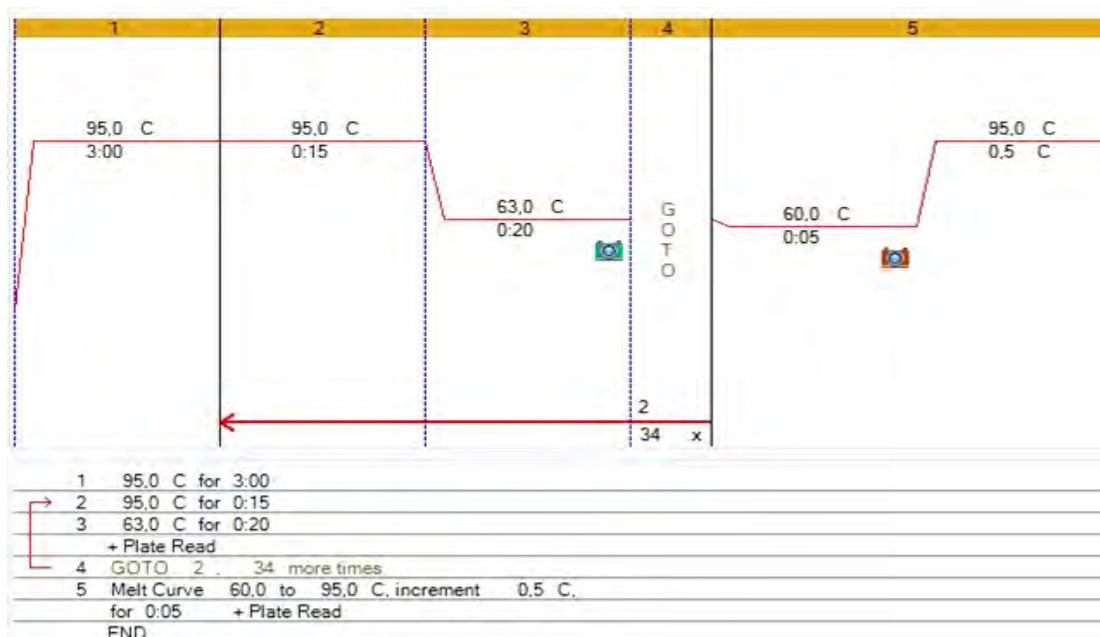
αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με PCR πραγματικού χρόνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και εκτίμηση της αφθονίας το γονιδίου 16S rRNA με PCR πραγματικού χρόνου.

Εκκινητές	Αλληλουχίες (5' - 3')
Eub338_F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Eub518_R	AATTACCGCGGCTGCTGG

Πίνακας 4. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου στα δείγματα εδάφους με PCR πραγματικού χρόνου.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μ L	1X
Forward primer (20 μ mol/ μ l)	0.1 μ L	0.2 μ M
Reverse primer (20 μ mol/ μ l)	0.1 μ L	0.2 μ M
BSA (20 μ g/ μ l)	0.2 μ L	400ng/ μ L
DNA(0.5ng)	1 μ L	0.5ng
ddH ₂ O	3.6 μ L	
Συνολικός όγκος	10 μ L	



Εικόνα 5. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση του συνολικού αριθμού των βακτηρίων μέσω ενίσχυσης 16s rRNA

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων των γονιδίων *mcd* και 16S rRNA στα δείγματα εδάφους κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς. Για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα τα γονίδια *mcd* και 16S rRNA αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 2.7×10^1 έως 2.7×10^6 αντίγραφα γονιδίου *mcd* και $3,6 \times 10^3$ έως $3,6 \times 10^9$ αντίγραφα 16S rRNA και πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε αραιώση.

2.6 Επιβεβαίωση της ενίσχυσης του γονιδίου *mcd* με αλληλούχιση

Για να επιβεβαιωθεί ότι το γονίδιο που ενισχύθηκε κατά την διάρκεια της PCR πραγματικού χρόνου είναι το *mcd* πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος PCR και αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων. Για την προετοιμασία των δειγμάτων για αλληλούχιση ακολούθησε εξαγωγή ζώνης PCR προϊόντων από πηκτή αγαρόζης, καθαρισμός των προϊόντων με το kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel, ένθεση του καθαρισμένου προϊόντος σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για να υπολογιστεί η κατάλληλη ποσότητα PCR προϊόντος (insert) που θα περιληφθεί στην αντίδραση ένθεσης χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\frac{ng \text{ of vector} * kb \text{ size of insert}}{kb \text{ size of vector}} * \frac{3}{1} = ng \text{ of insert}$$

Ακολούθησε μετασχηματισμός του πλασμιδιακού φορέα σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5α (Invitrogen). Ειδικότερα, στα κύτταρα προστέθηκε διάλυμα 2μl από την αντίδραση της λιγάσης και το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30 min και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ για 55 sec στους 42°C. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2 min και προστέθηκαν 200 μl LB. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 60min. Στη συνέχεια στα κύτταρα προστέθηκαν 50μl X-GAL 2% (διάλυση διμέθυλοφορμαμίδιο) και 10 μl IPTG 0,1M (0,238g IPTG, διάλυση σε 10ml ddH₂O). Η καλλιέργεια επιστρώθηκε σε τριβλία με LB με αμπικιλίνη (100μg/ml). Τα τριβλία επωάστηκαν στους 37°C κατά την διάρκεια της νύχτας. Ακολούθησε επιλογή τριών λευκών αποικιών και εμβολιασμός σε 5ml θρεπτικού διαλύματος LB με αμπικιλίνη. Οι εμβολιασμένες καλλιέργειες επωάστηκαν με συνεχή ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Μετά τις 16 ώρες έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με το kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα απομονωθέντα πλασμίδια απεστάλλησαν στην εταιρεία CEMIA, Λάρισα για αλληλούχηση.

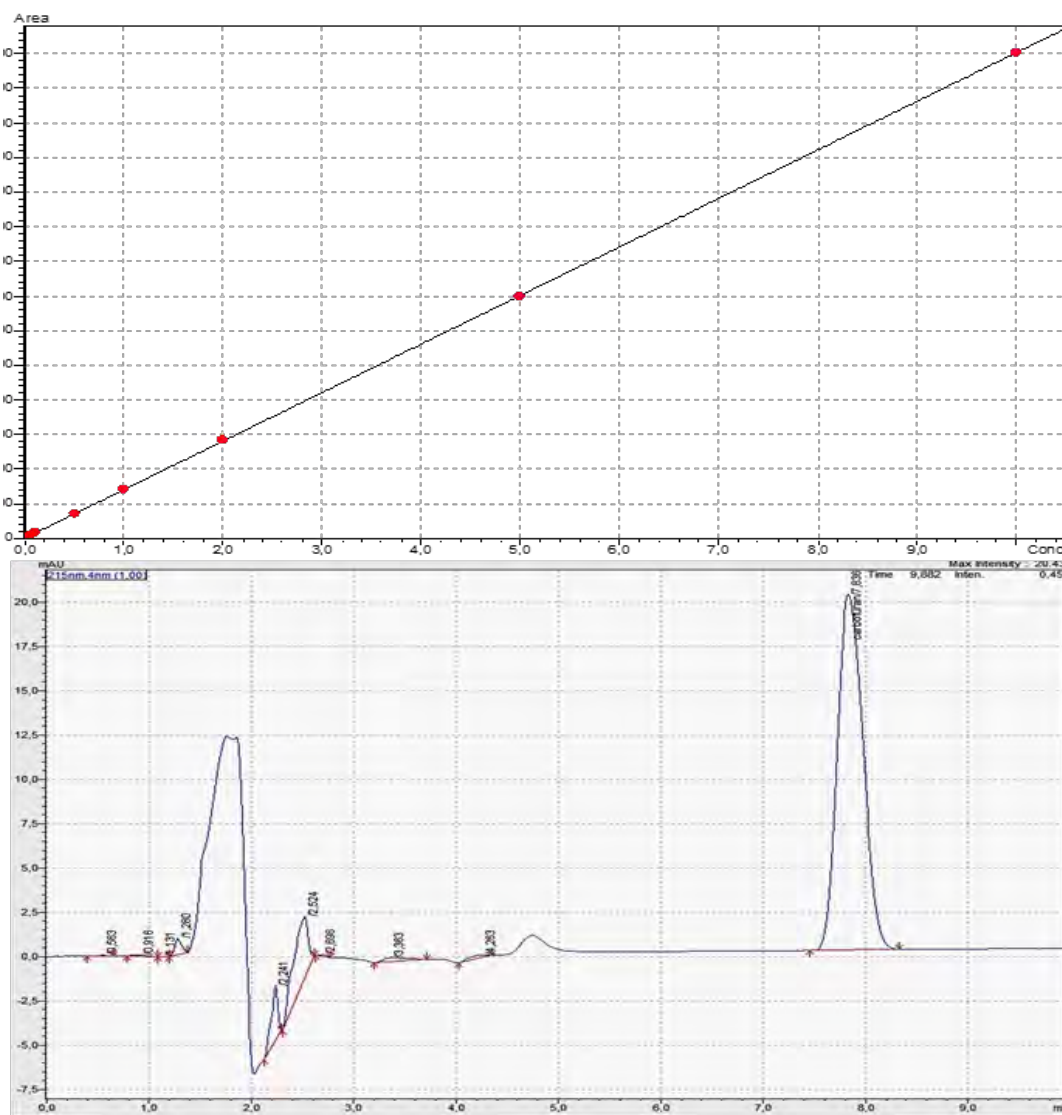
2.7 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR πραγματικού χρόνου

Οι αριθμοί των αντιγράφων του γονιδίου *mcd* προς τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA στα δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή carbofuran ή όχι χρησιμοποιήθηκαν στην στατιστική ανάλυση. Η επίδραση του carbofuran αλλά και του χρόνου και πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των δύο κύριων παραγόντων στον λόγο του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *mcd* προς τον συνολικό αριθμό των βακτηρίων έγινε με ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κύριων παραγόντων, σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο καθώς και σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων χρόνων σε κάθε μεταχείριση εντοπίστηκαν με Post hoc ανάλυση με χρήση του τεστ Tukey. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS statistics 20.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

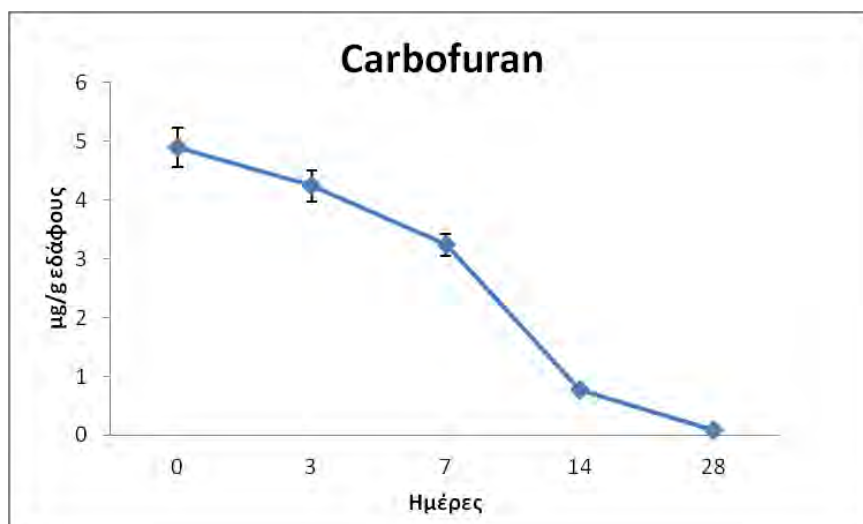
3.1 Αποδόμηση του carbofuran στο έδαφος

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται ενδεικτικά η καμπύλη αναφοράς και χρωματογράφημα από τον προσδιορισμό του carbofuran στα δείγματα εδάφους.



Εικόνα 6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του carbofuran σε σύστημα HPLC-PDA (α) καμπύλη αναφοράς (β) ενδεικτικό χρωματογράφημα όπου φαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στο carbofuran με συγκέντρωση 10mg/L και χρόνο ανάκτησης 7.84 min.

Η αποδόμηση του carbofuran στο έδαφος ήταν σχετικά ταχεία και ολοκληρώθηκε σε 28 ημέρες (Διάγραμμα 1).

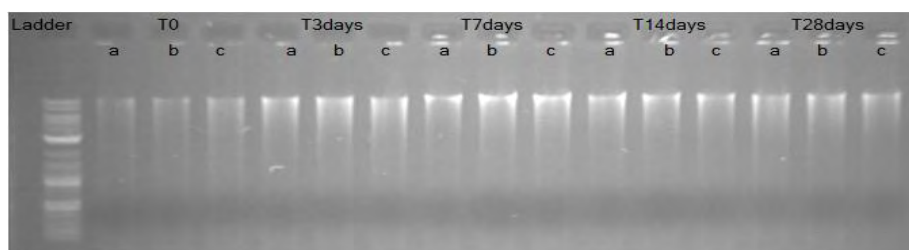


Διάγραμμα 1. Η αποδόμηση του carbofuran στο έδαφος που μελετήθηκε. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

Η ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα HPLC-UV έδειξε ότι το carbofuran έχει διασπαστεί πλήρως στις εικοσιοκτώ ημέρες μετά την εφαρμογή του στα δείγματα.

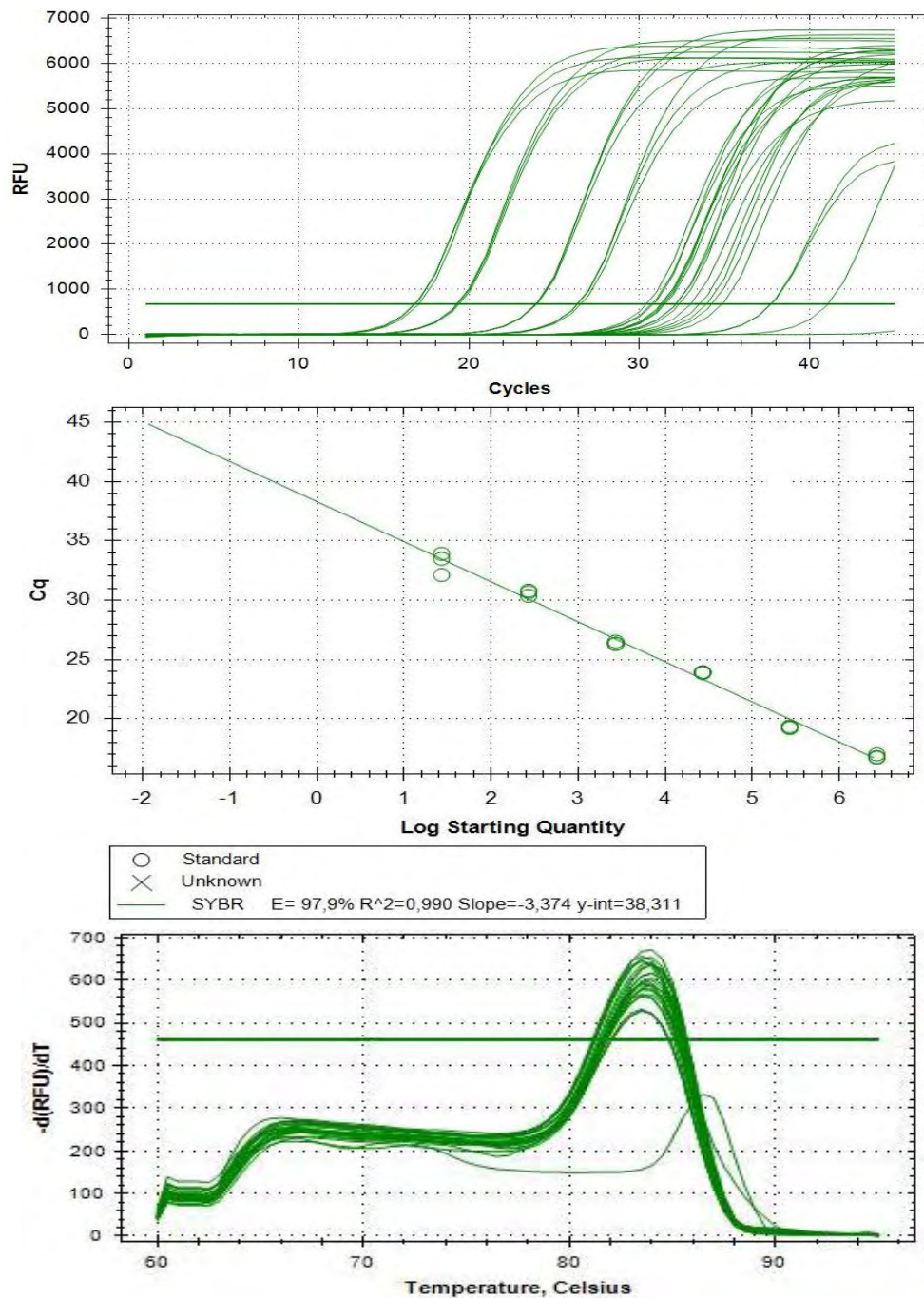
3.2 Εκτίμηση της αφθονίας των γονιδίων *mcd* και 16S rRNA

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης του DNA που εκχυλίστηκε από τα δείγματα εδάφους σε πηκτή αгарόζης. Όπως φαίνεται και από την πηκτή παραλήφθηκε υψηλού μοριακού βάρους DNA από τα δείγματα εδάφους.

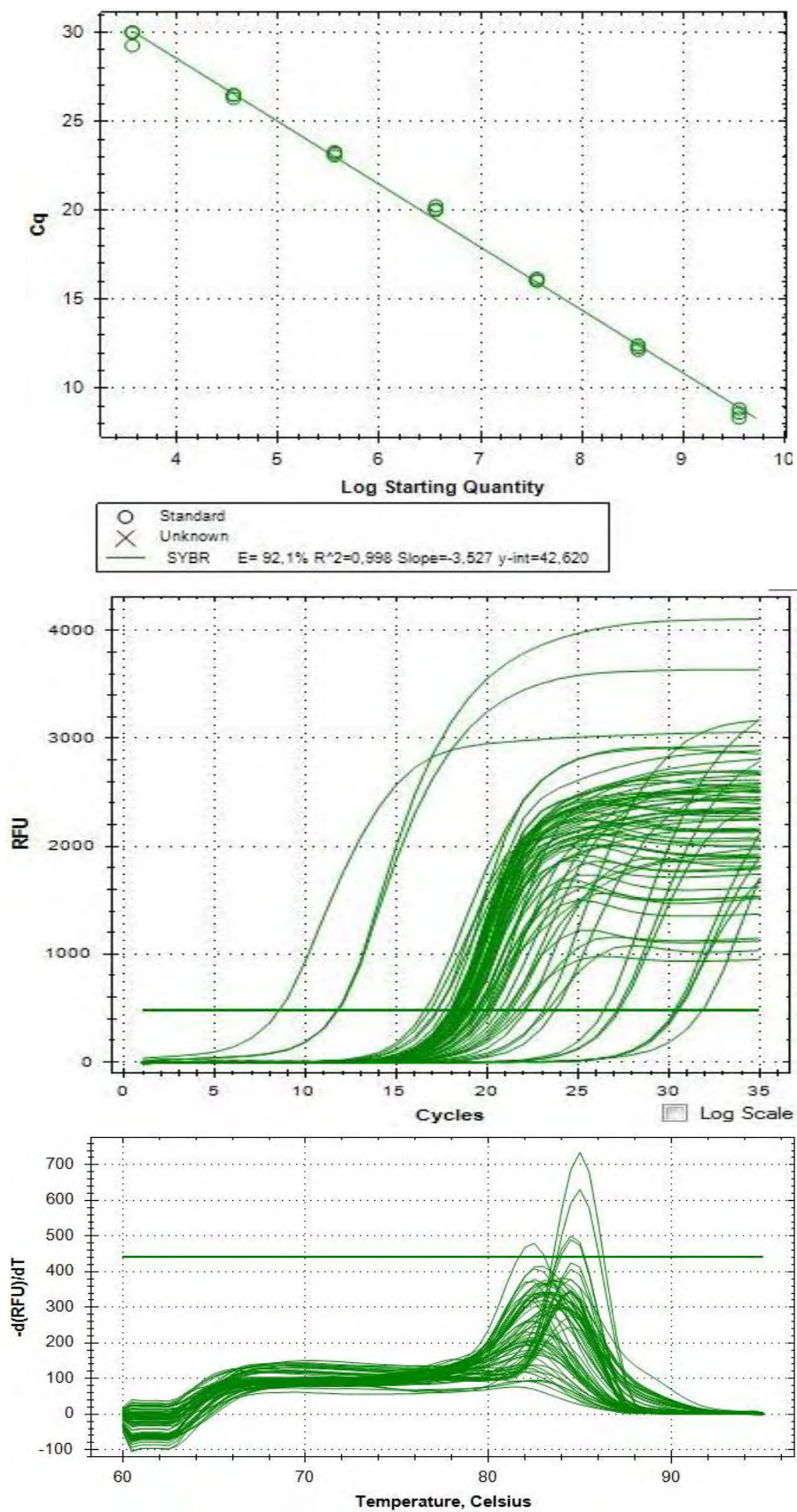


Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,8% εκχυλισμένου DNA από δείγματα εδάφους όπου έχει γίνει εφαρμογή carbofuran. Χρόνος δειγματοληψίας: 0, 3, 7, 14 και 28 ημέρες και για τον κάθε χρόνο υπάρχουν τρεις επαναλήψεις. Ladder: 2-Log DNA. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5μl DNA.

Στις Εικόνες 8 και 9 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς, ενίσχυσης και αποδιάταξης για τα γονίδια *mcd* και 16s rRNA. Όπως φαίνεται από τις καμπύλες αποδιάταξης και στις δύο περιπτώσεις ενισχύθηκε ένα μόνο προϊόν που αντιστοιχεί στο γονίδιο - στόχο. Στην περίπτωση του γονιδίου *mcd* αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με αλληλούχιση του προϊόντος που παραλήφθηκε σε επιλεγμένα δείγματα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 τα προϊόντα που ενισχύθηκαν κατά την PCR πραγματικού χρόνου εμφανίζουν 100% ομολογία με το γονίδιο *mcd* που έχει απομονωθεί από διάφορους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 8. Η καμπύλη ενίσχυσης (α), αναφοράς (β) και αποδιάταξης (γ) για την ενίσχυση του γονιδίου *mcd* με PCR πραγματικού χρόνου.

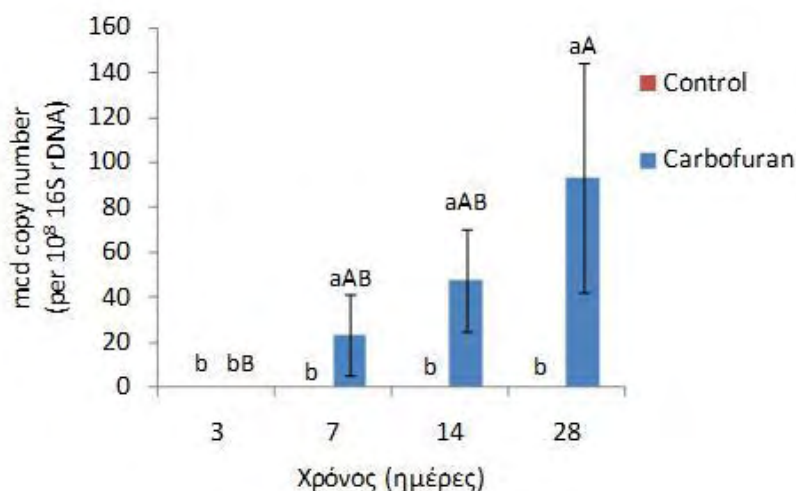


Εικόνα 9. Η καμπύλη αναφοράς (α), ενίσχυσης (β) και αποδιάταξης (γ) για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με PCR πραγματικού χρόνου.

Πίνακας 5. Τα αποτελέσματα της ομοπαράθεσης των αλληλουχιών που ενισχύθηκαν κατά την PCR πραγματικού χρόνου με στόχο το γονίδιο *mcd*

Αλληλουχίες με το υψηλότερο επίπεδο ομολογίας	Κωδικός αλληλουχίας	Επίπεδο ομολογίας
Unidentified microorganism methylcarbamate-degrading protein (<i>mcd</i>) gene, partial cds	AY294039.1	168/168 bp 100%
Aminobacter sp. C4 partial <i>mcd</i> gene for carbofuran hydrolase, isolate C4	AJ622940.1	168/168 100%
Achromobacter sp. WM111 plasmid pDL11 carbofuran hydrolase (<i>mcd</i>) gene, complete cds	AF160188.1	168/168 100%

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται οι μεταβολές στην σχετική αφθονία του γονιδίου *mcd* (ως λόγος του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου *mcd* / 10^8 16S rRNA / g εδάφους) στο έδαφος ύστερα από την εφαρμογή carbofuran και αντίστοιχα σε δείγματα εδάφους που δεν δέχτηκαν εφαρμογή carbofuran (μάρτυρας). Η εφαρμογή του carbofuran οδήγησε σε μια σταδιακή αύξηση της σχετικής αφθονίας του γονιδίου *mcd* που εμφάνισε την υψηλότερη τιμή του στις 28 ημέρες, δηλαδή με την ολοκλήρωση της αποδόμησης του carbofuran. Αντίθετα δεν ανιχνεύθηκαν σε επίπεδα άνω του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου αντίγραφα του γονιδίου *mcd* στα δείγματα μάρτυρες καθόλη την διάρκεια του πειράματος.



Διάγραμμα 2. Μεταβολές στην αφθονία του λόγου *mcd*/ 10^8 16S rRNA (σχετική αφθονία) σε δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή carbofuran καθώς και σε δείγματα μάρτυρες. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (επίπεδο σημαντικότητας 5%) παρουσιάζονται με διαφορετικά γράμματα. Ράβδοι που έχουν σημειωθεί με το ίδιο μικρό γράμμα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των control και carbofuran στον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας ενώ ράβδοι που έχουν σημειωθεί με το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας για την ίδια μεταχείριση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συσχέτιση μεταξύ της σχετικής αφθονίας του γονιδίου *mcd* και της αποδόμησης του carbofuran

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, σε έδαφος από το οροπέδιο του Λασιθίου της Κρήτης με ιστορικό χρήσης καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ουσιών όπως το oxamyl αλλά και παλαιότερα carbofuran, αρχικά η παρουσία του γονιδίου *mcd* που ελέγχει την υδρόλυση του carbofuran (Tomasek and Karns 1989). Ακολούθως διερευνήθηκαν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της αφθονίας του γονιδίου *mcd* και της αποδόμησης του carbofuran. Η πρώτη παρατήρηση μας ήταν ότι το γονίδιο *mcd* ανιχνεύθηκε στο μελετούμενο έδαφος αλλά μόνο ύστερα από την εφαρμογή carbofuran. Η ανίχνευση του συγκεκριμένου γονιδίου στο συγκεκριμένο έδαφος αποτελεί και την πρώτη αναφορά εντοπισμού της συγκεκριμένης υδρολάσης σε αγροτικά εδάφη στην Ελλάδα. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει εντοπιστεί κυρίως σε πλασμίδια βακτηρίων εδάφους, φυλλογενετικά μη συγγενών, τα οποία είχαν απομονωθεί από γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές όπως Αμερική, Γαλλία και Αγγλία και στις οποίες είχε παρατηρηθεί το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του carbofuran (Tomasek and Karns 1989, Torp et al. 1993, Desaint et al. 2000). Όλα τα παραπάνω ευρήματα καθώς και ο εντοπισμός του γονιδίου *mcd* και σε αγροτικά εδάφη του οροπεδίου Λασιθίου καταδεικνύουν την μεγάλη γεωγραφική διασπορά του η οποία έχει αποδοθεί σε οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (Desaint et al. 2003).

Από τις μετρήσεις προέκυψε ότι η εφαρμογή του carbofuran στο συγκεκριμένο έδαφος οδήγησε σε σημαντική αύξηση της σχετικής αφθονίας του *mcd* παράλληλα με την πορεία αποδόμησης του carbofuran. Το συγκεκριμένο μοτίβο αποδόμησης του carbofuran και σχετικής αφθονίας του γονιδίου *mcd* επιβεβαιώνει την εμπλοκή του *mcd* στην αποδόμηση του carbofuran. Η επιταχυνόμενη αποδόμηση του carbofuran μέχρι σήμερα έχει αποδοθεί στην παρουσία μικροοργανισμών που κατέχουν το γονίδιο *mcd* (Champalamdugu & Chaudhry, 1991).

Παράλληλα τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δείχνουν ότι παρά την πολυετή απουσία εφαρμογών carbofuran (8-9 έτη) στο συγκεκριμένο έδαφος, αντίγραφα του γονιδίου *mcd* διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα μεταξύ των μελών της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους και ενεργοποιούνται ύστερα από μια μόνο εφαρμογή του carbofuran στο έδαφος. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει αυξημένη εμμονή του φαινομένου της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του carbofuran και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και 4 έτη χωρίς εφαρμογή carbofuran δεν ήταν αρκετά για να εξαληφθεί (Karpouzias et al., 1999). Η διατήρηση της δεξαμενής του γονιδίου *mcd* στο έδαφος για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα θα μπορούσε να αποδοθεί στην

συχνή χρήση άλλων καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων όπως τα aldicarb (μέχρι το 2007) και oxamyl (μέχρι σήμερα) κατά την περίοδο που απαγορεύτηκε η εφαρμογή του carbofuran. Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την ύπαρξη διασταυρούμενης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης μεταξύ των oxamyl, aldicarb και carbofuran (Suett and Jukes, 1988). Ειδικότερα οι Chapman and Harris (1990) έδειξαν ότι πρότερη εφαρμογή oxamyl και aldicarb ενεργοποιεί την μικροβιακή κοινότητα για επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση και του carbofuran. Παρόλα αυτά καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν παρείχε αποδείξεις για την ταυτότητα των γονιδίων που εμπλέκονται. Πάντως *in vitro* μελέτες είτε με την MCD υδρολάση (Mulbry and Eaton 1991) είτε με βακτήρια που παρήγαγαν το συγκεκριμένο ένζυμο (Karns et al. 1986; Torp et al. 1993) δεν συνηγορούν υπέρ της παραπάνω υπόθεσης καθώς έδειξαν ότι το carbofuran αποτελεί το ιδανικότερο υπόστρωμα για την MCD υδρολάση ενώ τα οξιμινο καρβαμικά methomyl και aldicarb είτε δεν υδρολύονται καθόλου είτε υδρολύονται με πολύ βραδείς ρυθμούς αντίστοιχα. Περαιτέρω μελέτες που αποτελούν μέρος του διδακτορικού της Κ. Ρουσίδου έχουν δείξει ότι ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *mcd* στο συγκεκριμένο έδαφος δεν επηρεάζεται από την εφαρμογή άλλων καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ουσιών (oxamyl, pirimicarb, iprovalicarb, prosulfocarb κτλ) παρά μόνο από την εφαρμογή carbofuran καταδεικνύοντας την υψηλή εξειδίκευση της συγκεκριμένης υδρολάσης. Αντίθετα η εφαρμογή carbofuran και oxamyl οδηγεί στο ίδιο έδαφος σε σημαντική αύξηση των αντιγράφων του γονιδίου *cehA* που κωδικοποιεί μια άλλη υδρολάση καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ουσιών όπως το carbaryl (Hashimoto et al., 2002) αλλά και πρόσφατα του oxamyl (Rousidou et al., 2016)

Τα αποτελέσματα μας παρουσιάζουν σημαντικές πρακτικές προεκτάσεις καθώς δείχνουν ότι η αναστολή εφαρμογής ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος όπως το carbofuran, του οποίου η βιολογική δράση επηρεάζεται σημαντικά από το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης, δεν αποτελεί πάντα την λύση για την εξάλειψη του προβλήματος καθώς η δεξαμενή γονιδίων που υδρολύουν το συγκεκριμένο εντομοκτόνο παραμένει ζωντανή για τουλάχιστον 9 έτη και ενεργοποιείται με την νέα εφαρμογή του carbofuran στο έδαφος.

4.2 Μελλοντική έρευνα

Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στη μελέτη της αφθονίας περισσότερων γονιδίων που μπορεί να εμπλέκονται στη διάσπαση καρβαμιδικών ενώσεων όπως τα *cehA* και *cahA* (Hashimoto et al. 2006). Επίσης θα μπορούσε να μελετηθούν εδάφη από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, χωρίς καμία πρότερη εφαρμογή οποιασδήποτε ένωσης, με σκοπό τη διερεύνηση της απόκρισής τους στην εφαρμογή

καρβαμιδικών, με εξελικτικό στόχο, την πιθανή εύρεση προγονικών γονιδίων αυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως υπεύθυνα για τη διάσπαση των καρβαμιδικών.

5. Βιβλιογραφία

- Aldridge, W., & Magos, L. (1978). Carbamates, thiocarbamates, and dithiocarbamates Luxembourg, Commission of the European Communities.
- Chapalamadugu, S., & Chaudhry, R. G. (1991). Hydrolysis of Carbaryl by a *Pseudomonas* sp. and Construction of a Microbial Consortium That Completely Metabolizes Carbaryl. *Applied and Environmental Microbiology*, 744-750.
- Chapman, R., & Harris, C. (1990). Enhanced degradation of insecticides in soils. In: Racke, K.D., Coats, J.R., (Eds) *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*, American Chemical Society, Washington, DC,, 82-96.
- Chin-Pampillo, J. S., Carazo-Rojas, E., Pérez-Rojas, G., Castro-Gutiérrez, V., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2014). Accelerated biodegradation of selected nematicides in tropical crop soils from Costa Rica. *Environ Sci Pollut Res*.
- Desaint, S., Arrault, S., Siblot, S., & Fournier, J.-C. (2003). Genetic transfer of the mcd gene in soil bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102–108.
- Desaint, S., Hartmann, A., Parekh, N. R., & Fournier, J.-C. (2000). Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 34, 173-180.
- Felsot, A. (1989). Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for argoecosystems. *Annual Review of Entomology* 34:, 453-476.
- Felsot, A., & Shelton, D. (1993). Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical process and microbial ecology. *SSSA Special Publication* 32:, 227-251.
- Feng, X., Ou, L.-T., & Ogram, A. (1997). Plasmid-Mediated Mineralization of Carbofuran by *Sphingomonas* sp. Strain CF06. *Applied and Environmental Microbiology*, 1332-1337.
- Gabor, E., Vries, E., & Janssen, D. (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology* 44:, 153-163.
- Goldberg, M., Jonhson, H., Knaak, J., & Smyth, H. J. (1963). Psychopharmacological effects of reversible cholinesterase inhibition induced by N -methyl-3-isopropyl-phenyl carbamate (compound 10854). *J. Pharm. exp. Ther.*, 141, 244-252.
- Hashimoto, M., Fukui, M., Hayano, K., & Hayatsu, M. (2002). Nucleotide Sequence and Genetic Structure of a Novel Carbaryl Hydrolase Gene (cehA) from *Rhizobium* sp. Strain AC100. *Applied and Environmental Microbiology*, σσ. 1220-1227.
- Hashimoto, N., Mizutani, A., Tago, K., Ohnishi, M., Kameyama, Shimojo, T., & Hayatsu, M. (2006). Cloning and Nucleotide Sequence of Carbaryl Hydrolase Gene (cahA) from *Arthrobacter* sp. RC100. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, σσ. 101: 410-414.

- Hayatsui, M., & Nagata, T. (1993). Purification and Characterization of Carbaryl Hydrolase from *Blastobacter* sp. Strain M501. *Applied and Environmental Microbiology*, 2121-2125.
- Karns, J. S., Mulbry, W. W., Nelson, J. O., & Kearney, P. (1986). Metabolism of Carbofuran by a Pure Bacterial Culture. *Pesticide Biochemistry Physiology* 25, 211-217.
- Karpouzas, D. G., Morgan, J., & Walker, A. (2000). Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. *Letters in Applied Microbiology*, 353-358.
- Karpouzas, D. G., Walker, A., & Froud-Williams, R. J. (1999). Evidence for the enhanced biodegradation of ethoprophos and carbofuran in soils from Greece and the UK. *Pesticide Science*, 301-311.
- Karpouzas, D. G., Walker, A., Drennan, D. S., & Froud-Williams, R. J. (2001). The effect of initial concentration of carbofuran on the development and stability of its enhanced biodegradation in top-soil and sub-soil. *Pest Management Science*, 72-81.
- Mulbry, W. W., & Eaton, R. W. (1991). Purification and Characterization of the N-Methylcarbamate Hydrolase from *Pseudomonas* Strain CRL-OK. *Applied and Environmental Microbiology*, 3679-3682.
- Ogram, A., Sayler, G., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7:, 57-66.
- Parekh, N. R., Hartmann, A., & Fournier, J.-C. (1996). PCR detection of the mcd gene and evidence of sequence homology between the degradative genes and plasmids from diverse carbofuran-degrading bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 1797-1804.
- Parekh, N. R., Hartmann, A., Charnay, M.-P., & Fournier, J.-C. ((1995)). Diversity of carbofuran-degrading soil bacteria and detection of plasmid-encoded sequences homologous to the mcd gene . *FEMS Microbiology Ecology* 17, 149-160 .
- Racke, K., & Coats, J. (1988). Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: Specificity of enhanced microbial degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36:, 193-199.
- Read, D. (1986). Accelerated microbial breakdown of carbofuran in soil from previously treated fields. *Agriculture Ecosystems and Environment* 15:, 51-61.
- Reiner, E. (1971). Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamylated cholinesterases. *Bull. World Health Org.*, 44, 109-112.
- Reiner, E., & Aldridge, W. (1967). Effect of pH on inhibition and spontaneous reactivation of acetylcholin esterase treated with esters of phosphoric acids and of carbamic acids. *Biochem. J.*, 105, 171-179.
- Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T., & Simonet, P. (2003). Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology* 39:, 183-190.
- Roose-Amsaleg, C., Garnier-Sillam, E., & Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 18:, 47-60.

- Rousidou, C., Chanika, E., Georgiadou, D., Soueref, E., Katsarou, D., Kolovos, P., . . . D.G, K. (2016). Isolation of oxamyl-degrading bacteria and characterization of the metabolic pathway and the genes involved in its metabolism. *Frontiers in Microbiology (submitted)*.
- Sakai, K., & Matsumura, F. (1968). Esterases of mouse brain active in hydrolysing organophosphate and carbamate insecticides. *J. agric. food Chem.*, 16(5), 803-807.
- Sakai, K., & Matsumura, F. (1971). Degradation of certain organophosphate and carbamate insecticides by human brain esterases. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 19(4), 660-666.
- Sonawane, B., & Knowles, C. (1971). Phenmedipham and m -aminophenol decomposition in alkaline soil. *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, 6:, 322-327.
- Suett, D., & Jukes. (1988). Accelerated degradation of aldicarb and its oxidation products in previously treated soils. *Crop Protect*, σσ. 147-152.
- Tomasek, P. H., & Karns, J. S. (1989). Cloning of a Carbofuran Hydrolase Gene from *Achromobacter* sp. Strain WM111 and Its Expression in Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 4038-4044.
- Topp, E., Vallaey, T., & Soulas, G. (1995). Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms.
- Torsvik, V. (1980). Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 12:, 15-21.
- Vandekar, M. (1965). Observations on toxicity of carbaryl, folithion, and 3-isopropylphenyl-N -methylcarbamate in a village-scale trial in Southern Nigeria. *Bull. World Health Org.*, 33:, 107-115.
- Vandekar, M., Plestina, R., & Wilhelm, K. (1971). Toxicity of carbamates for mammals. *Bull. World Health Org.*, 44:, 241-249.